

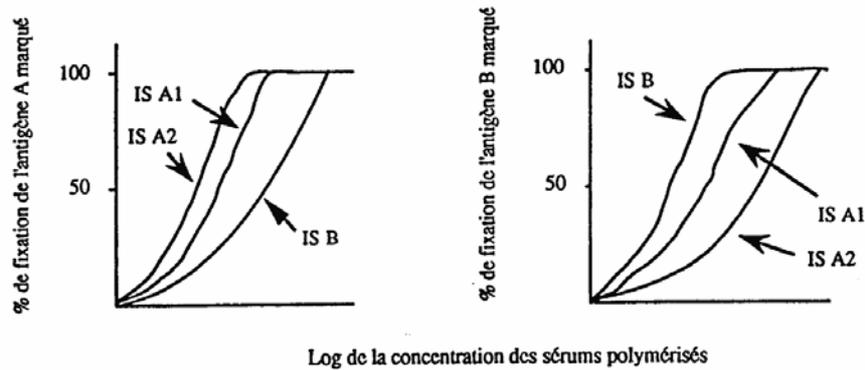
## Reconnaissance classique

### I.

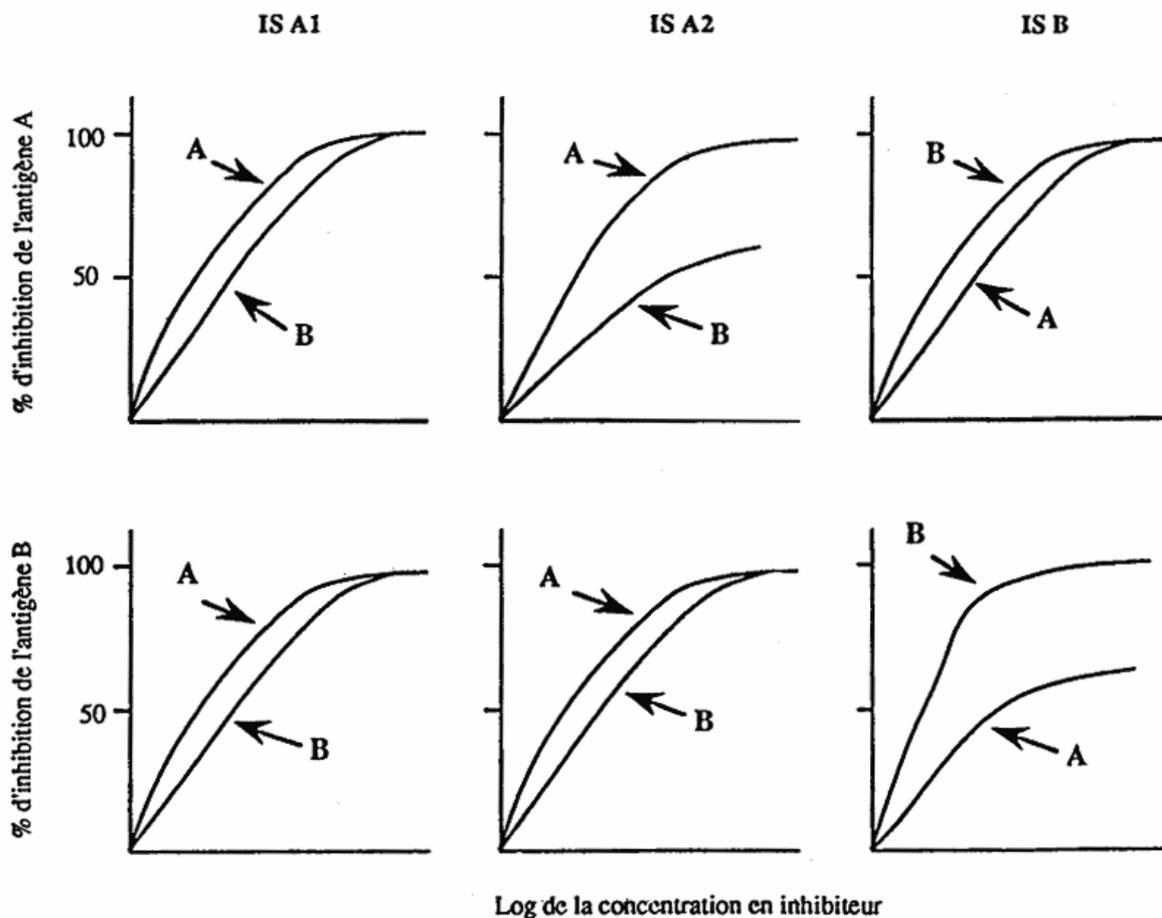
Des immunosérums sont préparés contre deux antigènes A et B :

- deux immunosérums ISA1 et ISA2 sont dirigés contre l'antigène A ;
- un immunosérum ISB est dirigé contre l'antigène B.

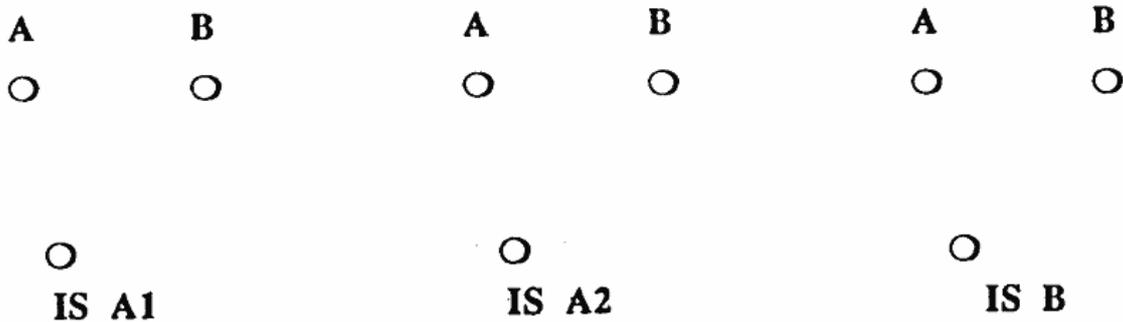
Ces trois immunosérums précipitent en milieu liquide les antigènes A et B. Les courbes de fixation des antigènes marqués sur les sérums insolubilisés sont les suivantes :



L'inhibition de la fixation des antigènes marqués sur les différents immunosérums, par A et B froids, donne les résultats suivants :



Question 1. Que peut-on conclure de ces résultats ? Complétez, sur la base de ces conclusions, les schémas suivants (précipitation en milieu gélifié) :

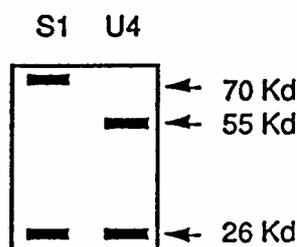


**II.**

L'hybridome S1 a été obtenu en fusionnant les cellules d'un myélome non sécréteur avec les cellules spléniques d'une souris immunisée contre la phosphorylcholine (PC) couplé à de l'hémocyanine. S1 synthétise un anticorps d'isotype  $\mu, \kappa$ . Après un nouveau clonage de l'hybridome S1, 30000 clones sont obtenus, l'un d'eux (U4) est particulièrement étudié.

Les cellules S1 ou U4 sont cultivées en présence de méthionine  $^{35}S$ . Les immunoglobulines sécrétées sont précipitées par un sérum de lapin anti- $\kappa$ , puis réduites et déposées sur un gel SDS de polyacrylamide. L'autoradiographie de ce gel est présentée sur la **Figure 1** :

**Figure 1**



Question 1. Proposer au moins deux hypothèses pour expliquer ces résultats.

La spécificité des immunoglobulines sécrétées par U4 est analysée par des tests d'hémagglutination. Une éventuelle activité anti-PC est recherchée vis-à-vis de la phosphorylcholine couplée aux globules rouges de mouton (PC-GRM). Les titres agglutinants obtenus sont présentés dans le **Tableau 1** :

**Tableau 1**

Surnageant de culture	GRM	PC-GRM	Hémagglutination de PC-GRM en présence d'un sérum amplificateur	
			Anti-IgM	Anti-IgG1
S1	0*	7	7	7
U4	0	0	0	5

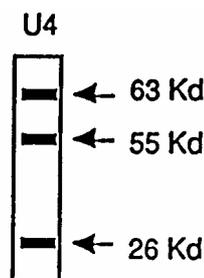
\* Titre d'hémagglutination

Question 2. Ces nouvelles données permettent-elles d'étayer l'une des hypothèses formulées précédemment ?

Les cellules U4 sont cultivées en présence de méthionine <sup>35</sup>S, puis lysées. Les immunoglobulines ainsi synthétisées sont précipitées par un anti-κ, réduites et déposées sur un gel SDS de polyacrylamide. La Figure 2 ci-dessous présente l'autoradiographie obtenue.

Question 3. Comment expliquer la présence des deux chaînes lourdes ? Est-ce compatible avec le caractère monoclonal des hybridomes ?

Figure 2



N.B. : La séquence partielle NH2-terminale des deux chaînes lourdes est identique au VH de S1.

### III.

Une protéine de myélome, de souris BALB/c, appelée TEPC15, et qui possède une spécificité anti-phosphorylcholine (PC), est injectée à une souris de souche A/He. Les splénocytes immuns sont fusionnés aux cellules d'un myélome non sécréteur de souris BALB/c. La spécificité des anticorps monoclonaux anti-T15 est analysée en inhibant l'interaction T15 radioactif/anticorps monoclonaux par d'autres anticorps monoclonaux ou des protéines de myéomes tous d'origine BALB/c (Tableau 2).

Tableau 2

Hybridomes	Inhibiteurs											
	a	T15	167	603	HPCM2	G1	G3	61	558	104	109	315
anti-T15	b	κ,α	κ,α	κ,α	κ,μ	κ,γ1	κ,γ3	κ,α	λ,α	λ,μ	κ,α	λ,α
	c	PC	PC	PC	PC	PC	PC	Lev	Lev	Dex	Lev	TNP
S1 60		+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
S1 04		+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
2E8		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F6		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

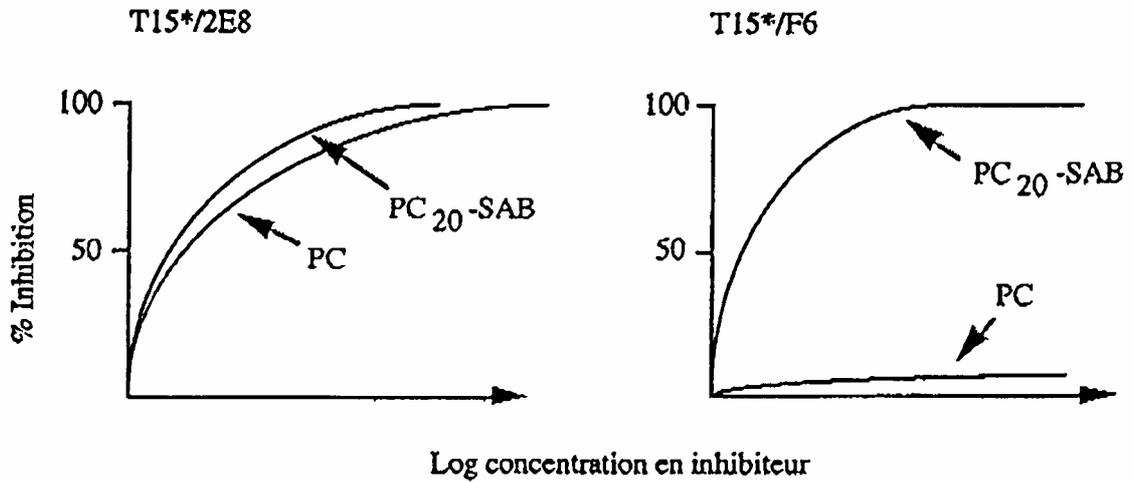
a: Nomenclature des inhibiteurs,  
 b: Isotype des chaînes légère et lourde,  
 c: Nature de l'antigène reconnu  
 PC = phosphorylcholine. Lev = Levane. Dex = Dextrane. TNP = trinitrophenol.  
 + = inhibition, - = pas d'inhibition.

Question 1. Quelle peut être la spécificité de chaque anticorps monoclonal ?

L'interaction T15 radioactif/anticorps 2E8 ou anticorps F6 est étudiée en présence de l'antigène PC ou de ce dernier couplé à la sérum albumine bovine (PC<sub>20</sub>-SAB). La **Figure 3** résume les caractéristiques de ces inhibitions.

Question 2. *Interpréter ces résultats.*

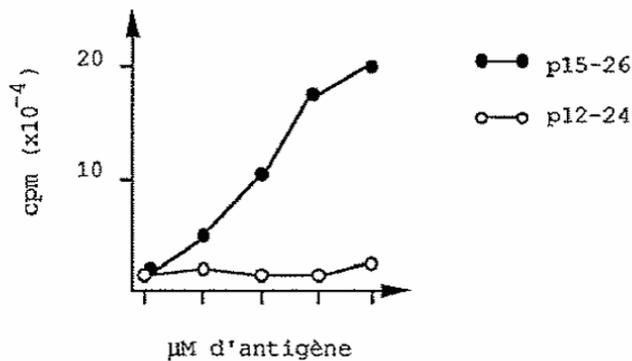
Figure 3



**IV.**

Un clone "auxiliaire" de lymphocyte T (7B7), issu d'une souris BALB/c (H-2<sup>d</sup>), est obtenu contre le répresseur du bactériophage lambda. L'activation de ce clone est étudiée à l'aide de peptides dérivés du répresseur dans le test suivant: 5x10<sup>4</sup> cellules 7B7 sont mélangées à 5x10<sup>4</sup> cellules présentatrices d'antigènes en présence de différentes concentrations de peptide. Après 24h d'incubation, 50 µl de surnageant sont ajoutés à 10<sup>4</sup> cellules d'un clone T cytotoxique dépendant de l'IL2. L'incorporation de thymidine tritiée est ensuite déterminée. Les résultats sont présentés sur la **Figure 4**.

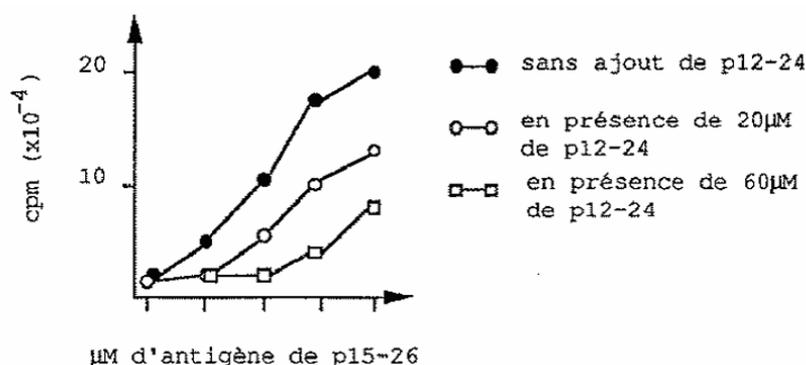
Figure 4



D'autre part, l'activation observée avec le peptide p15-26 est inhibée par un anticorps spécifique de I-A<sup>d</sup> mais pas par un anticorps spécifique de I-E<sup>d</sup>.

Dans une autre expérience, l'activation par le peptide p15-26 est effectuée en présence du peptide p12-24. Les résultats sont présentés sur la **Figure 5**.

Figure 5



**Question 1.** Interpréter ces résultats en précisant comment le peptide p12-24 peut inhiber l'activation du clone 7B7 ?

La capacité inhibitrice du peptide p12-24 est testée dans différents systèmes antigéniques de façon analogue à celle décrite ci-dessus. La compilation des résultats est présentée dans le **Tableau 3**. La fixation directe du peptide p12-24 sur les molécules de classe II est déterminée par dialyse à l'équilibre comme présentée sur le **Tableau 4**.

**Question 2.** Analyser l'ensemble de ces résultats

Tableau 3

Antigène reconnu par le clone T	Elément de restriction	Pouvoir inhibiteur du peptide p12-24
Ovalbumine	I-A <sup>d</sup>	+
Myoglobine	I-E <sup>d</sup>	+++
Lysozyme	I-A <sup>k</sup>	-
Cytochrome c	I-E <sup>k</sup>	+

Tableau 4

Antigène de classe II	Fixation du peptide
I-A <sup>d</sup>	+
I-E <sup>d</sup>	+++
I-A <sup>k</sup>	-
I-E <sup>k</sup>	+

V.

Une lignée de souris mutantes est obtenue à partir de souris de la lignée consanguine B10.BR (H-2<sup>k</sup>). L'impact de cette mutation sur le système immunitaire est recherché. Les souris B10.BR et mutantes sont immunisées contre l'ovalbumine (OVA). La production d'anticorps contre l'antigène est recherchée. Les résultats sont présentés dans le **Tableau ci-dessous**.

	Souris B10.BR	Souris mutante
Anticorps anti-OVA	+++++	+

Question 1. Commenter.

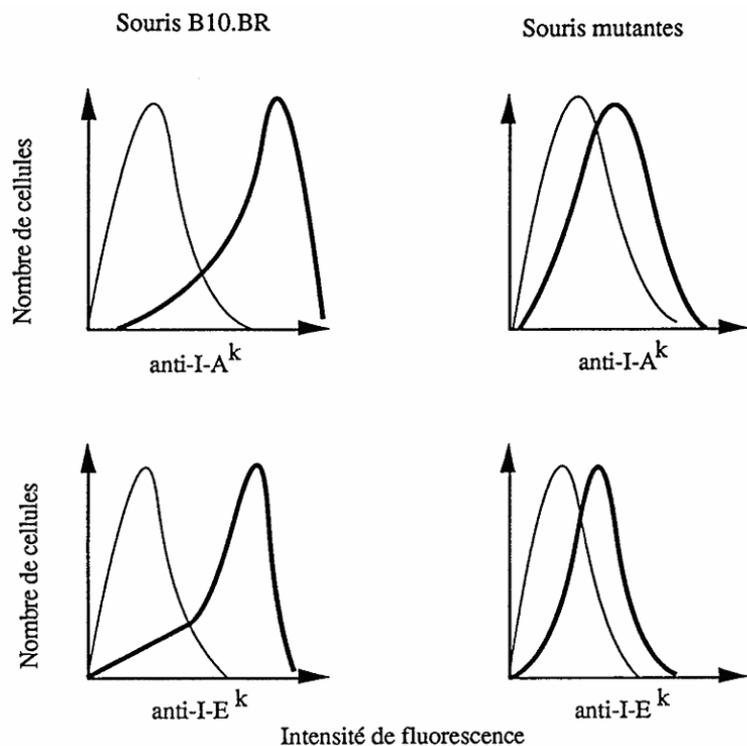
Les cellules spléniques sont isolées à partir des deux types de souris. Grâce à un trieur de cellules, les cellules marquées avec un anticorps anti-IgM fluorescent sont séparées et utilisées dans les trois expériences décrites ci-dessous.

Expérience n°1 : Les cellules sont marquées à l'aide des anticorps monoclonaux anti-I-A<sup>k</sup> ou anti-I-E<sup>k</sup> couplés à un fluorochrome et analysées par cytofluorométrie.

Les résultats sont présentés sur la **Figure 6**.

**Figure 6 : Fluorescence des cellules spléniques IgM<sup>+</sup>.**

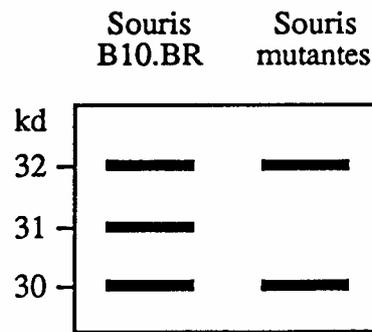
Les courbes présentées en trait fin correspondent à l'autofluorescence des cellules.



Expérience n°2 : Les cellules sont cultivées *in vitro* en présence de cystéine et de méthionine <sup>35</sup>S puis lysées. Le lysat est incubé en présence de l'anticorps monoclonal anti-I-A<sup>k</sup> insolubilisé. Les produits immunoprécipités sont ensuite chauffés à 95°C puis déposés sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE). Après migration électrophorétique, le gel est séché et autoradiographié. Les résultats sont présentés sur la **Figure 7**.

**Figure 7 :**

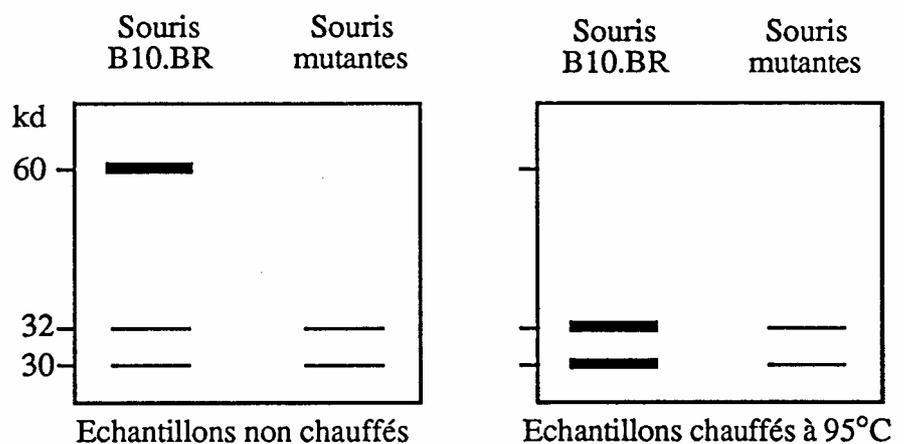
Analyse par SDS-PAGE des protéines immunoprécipitées par anti-I-A<sup>k</sup>.



Expérience n°3 : Les cellules sont marquées à leur surface à l'aide de l'iode 125 puis lysées. La même expérience d'immunoprécipitation que ci-dessus est réalisée. Cependant, les échantillons immunoprécipités sont ou non chauffés à 95°C avant d'être déposés sur le gel. Les résultats sont présentés sur la **Figure 8**.

**Figure 8 :**

Analyse par SDS-PAGE des protéines immunoprécipitées par anti-I-A<sup>k</sup>.



**Question 2.** *Interpréter ces expériences en indiquant notamment pourquoi les cellules IgM<sup>+</sup> ont été sélectionnées.*

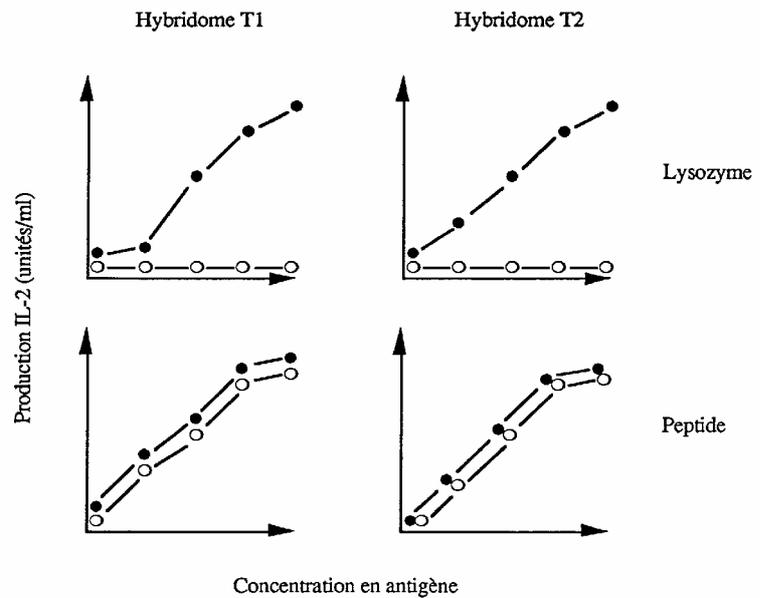
Deux hybridomes T (T1 et T2) obtenus contre le lysozyme de poulet sont testés pour leur capacité à produire de l'interleukine 2 (IL-2) en réponse à l'antigène. Celui-ci est présenté par des cellules spléniques provenant des deux types de souris. Les hybridomes T1 et T2 reconnaissent respectivement les peptides L46-61 et L112-129 présentés dans un contexte I-A<sup>k</sup>. Les résultats sont résumés sur la **Figure 9**.

**Question 3.** *Décrire succinctement un test permettant de mesurer la production d'IL-2.*

**Question 4.** *Quelles informations supplémentaires les résultats de la Figure 9 apportent-ils ?*

**Figure 9 :**

IL-2 produite après stimulation des hybridomes T1 et T2 par des cellules spléniques de souris B10.BR (●) ou mutantes (○) en présence de lysozyme (en haut) ou du peptide correspondant (en bas).

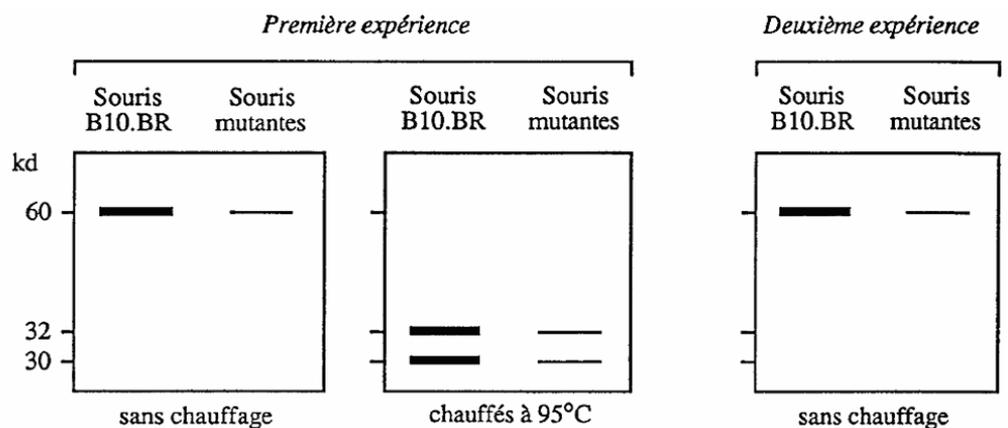


Afin de mieux comprendre l'observation ci-dessus, les expériences suivantes sont réalisées (**Figure 10**) :

- Dans une première expérience, les cellules spléniques des souris B10.BR ou mutantes sont marquées à leur surface à l'iode 125 et lysées. Avant immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-I-A<sup>k</sup> insolubilisé, les lysats sont incubés en présence du peptide L46-61. Les échantillons sont ensuite chauffés ou non comme précédemment et déposés sur gel de polyacrylamide.
- Dans la seconde expérience, les cellules spléniques des souris B10.BR ou mutantes sont incubées en présence du peptide L46-61 marqué à l'iode 125 puis lysées. Une immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-I-A<sup>k</sup> est effectuée. L'échantillon immunoprécipité est déposé sur le gel de polyacrylamide sans chauffage.

**Figure 10 :**

Analyse en SDS-PAGE des échantillons immunoprécipités par l'anticorps anti-I-A<sup>k</sup>.



**Question 5.** Interpréter ces résultats en les corrélant avec ceux des expériences précédentes.

**Question 6.** Proposer un schéma simple rendant compte du défaut de présentation de l'antigène par les cellules de la souris mutante.